ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การสกัดเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตสจากเมล็ดพืชบางชนิดที่กำลังงอก และการทำให้บริสุทธิ์

ชื่อผู้เ ชียน

นายรุ่ง พันธ์ศรีวงค์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาชาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์:

อาจารย์ ดร.บัณฑิต ลีละศาสตร์ ประธานกรรมการ อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ กิจจนะพานิช กรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ สาระเวก กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาเอนไซม์แอชิดฟอสฟาเตสจากเมล็ดพืชที่กำลังงอก 5 ชนิต คือ ถั่วเชียว ถั่วเหลือง ช้าวโพด ช้าวสาลี และช้าวเหนียว พบว่าส่วนสกัดหยาบเอนไซม์จากต้นอ่อนถั่วเชียว มีค่า แอคติวิตีสูงสุด จึงคัดเลือกถั่วเชียวเป็นแหล่งเอนไซม์ที่น้ำมาศึกษาคุณสมบัติต่อไป เมื่อศึกษาความ ลัมพันธ์ชองอายุชองต้นอ่อนกับแอคติวิตี พบว่าเมื่ออายุ 3 วัน มีแอคติวิตีสูงสุดในทุกส่วน และเมื่ออายุ 6 วัน เฉพาะบริเวณยอดมีแอคติวิตีสูงสุด ส่วนสกัดหยาบเอนไซม์ที่ได้จากยอด มี pH ที่เหมาะสมเป็น 6.2 อุณหภูมิทีเหมาะสมเป็น 55 ช และเอนไซม์จะเสียสภาพที่อุณหภูมิ 70-80 ช ในเวลา 10 นาที ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 4 ชั้นตอน คือ การตกตะกอนด้วย 25-75% ของสารละลายอิมตัว แอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซีสด้วยถุงไดอะไลซีสที่มีมวลโมเลกุล Cut off 10,000 และ แอกด้วย CM-Sephadex C-50 ตามด้วย Sephadex G-200 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เป็น 4.05, 5.74, 28.83 และ 142.38 เท่า ตามลำดับ และมีเปอร์เซนต์ของผลิตภัณฑ์ โดย polyacrylamide gel electrophoresis จะได้แถบชองโปรตีนเพียง 1 แถบ มีค่าการ เคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.38 และตรวจสอบแอคติวิตีชองเอนไชม์บนเจลโดยวิธีชอง Bessey เป็น การยืนยันได้ว่าเป็นแอคติวิตี้ชองเอนไชม์แอชิดฟอสฟาเตสจริง

เอนไชม์ที่บริสุทธิ์แล้วมี pH ที่เหมาะสมเป็น 6.2 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 55°C เช่นเดียวกับส่วนสกัดหยาบเอนไซม์ จากการหามวลโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น มีค่า ประมาณ 57,000 มีค่า Km และ Vmax สำหรับ p-nitrophenyl phosphate เป็น 1.67 mM และ 27.03 pmol/min ตามลำดับ



Thesis Title

Extraction and Purification of Acid Phosphatase from Some Plant Seeds During Germination

Author

Mr. Roong Punsriwong

M.S.

Chemistry

Examining Committee:

Lecturer.Dr. Bundit Leelasart

Lecturer.Dr. Pairot Kitchanapanich

Assist. Prof. Dr. Sirirat Sarawak

Chairman

Member

Member

Abstract

The studies of enzyme acid phosphatase from 5 species of seeds during germination, namely green bean, soybean, corn, wheat and rice, revealed that the crude enzyme from green bean had the highest activity. Green bean was therefore choosen as the enzyme source for subsequent investigation on its properties. Green bean aging was found to be related with the activity. All parts of the plant exhibited the highest activity after 3 days aging and after 6 days aging the highest activity was found at the top part and cotyledon. The crude enzyme was found to have the optimum pH at 6.2, the optimum temperature at 55 °C and denatured at 70-80 °C for 10 minutes. The 4 steps of purification were precipitation by 25-75% saturation of ammonium sulfate, dialysis with dialysing membrane for 10,000 molecular weight cut-off, CM-Sephadex C-50

column and Sephadex G-200 column. The increased purity values obtained were 4.05, 5.74, 28.83 and 142.38 folds and the percentage yields were 57.50%, 53.11%, 36.99% and 4.68% respectively.

The test of enzyme purification by polyacrylamide gel electrophoresis yielded only one protein band with the value of mobility of 0.38 and the activity test of the enzyme on gel by Bessey's method confirmed that it was acid phosphatase.

The purified enzyme had the optimum pH at 6.2 and the optimum temperature at 55°C in the same way as the crude enzyme. It was found that the molecular weight of this enzyme was about 57,000 with the value of Km and Vmax for p-nitrophenyl phosphate as 1.67 mM and 27.03 µmol/min respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Copyright[©] by Chiang Mai University All rights reserved